2010年11月制定1版

商品コード：F111－1K

「植物異物同定用プライマーセット」

取扱説明書

【特徴】

食品等に混入した異物の同定においては、微量のサンプルを同定する必要があります。微量のサンプルが植物や昆虫に由来する場合、形態的な特徴を指標にした同定方法が現在主流ですが、こうした同定方法は熟練された解析技術を必要とするため、簡便に正確で詳細な同定は行い難い問題があります。また、異物は極微量であったり、加熱等で変性している場合が多いため、これらを同定することは困難です。一方、近年DNAの塩基配列情報を客観的な指標とする同定方法が提案されています。

本製品は、PCR法により植物に由来する異物のDNAを増幅する試薬です。シーケンサーを用いPCR増幅産物の塩基配列を決定後、公共のデータベース等でBLAST検索を行うことにより、植物由来の異物を同定することが出来ます。また、本製品は、カビ・酵母の DNA に存在する内部転写スペーサー(ITS)領域が増幅されることを回避して、植物に特異的なITS領域を増幅することが出来ます。

【内容】

植物異物同定用プライマー（F-primer）　・・・　25μL（30反応分、濃度：25μM）　×1本
植物異物同定用プライマー（R-primer）　・・・　25μL（30反応分、濃度：25μM）　×1本

【保存方法】

- 20℃で保存

【使用期限】

外装に記載

【本製品以外に必要な試薬および機器類（PCRに関する部分)】

試薬　AmpliTaq Gold、10×PCR bufferⅡ、$MgCl_2$ with dNTP［アプライドバイオシステムズ社製］または同等の結果が得られるものを用いる
アガロースゲル
ゲルローディングバッファー
電気泳動用バッファー
DNA分子量マーカー
エチジウムブロミド溶液

機器類　PCR増幅反応装置　GeneAmp PCR System 9600、9700、Veriti サーマルサイクラー［アプライドバイオシステムズ社製］または同等の結果が得られるものを用いる
電気泳動装置
画像解析装置
マイクロピペット
ボルテックスミキサー
卓上遠心機

【実施例】

試薬調製およびPCR増幅反応

1. 酵素以外のPCR反応試薬を解凍した後､ボルテックスミキサー等で撹拌し卓上遠心機等でスピンダウンする。
2. 酵素は冷凍庫で保存し、使用直前に卓上遠心機等でスピンダウンする。
3. 反応液組成表に従い、DNA 試料液以外の試薬を必要量調製し、ボルテックスミキサー等で混合し、卓上遠心機等でスピンダウンする。
4. 調製した溶液から22.5μLずつをPCR用反応チューブに分注する。
5. DNA試料液をPCR用反応チューブに2.5μLずつ加えた後、PCR増幅反応装置にセットする。
6. PCR反応条件に従って、PCRを開始する。

※　反応系へのコンタミネーションがないことを確認するためには、プライマー対を加えないものならびに DNA 液を加えないものを陰性コントロールとし、DNA試料液と同時にPCRを行う。

反応液組成表
（AmpliTaq Gold［アプライドバイオシステムズ社製］を使用した例）

試薬	終濃度	添加量 (μL/tube)
滅菌水	―	14.875 μL
10×PCR Buffer Ⅱ(-$MgCl_2$)	×1	2.5 μL
dNTP mixture	0.2mM	2.5 μL
$MgCl_2$ (25mM)	1.5mM	1.5 μL
AmpliTaq Gold (5U/μL)	0.625U	0.125 μL
F-primer (25μM)	0.5μM	0.5 μL
R-primer (25μM)	0.5μM	0.5 μL
Template DNA	適当濃度	2.5 μL
Total		25 μL

PCR 反応条件

℃	min	
94℃	9min	
96℃	1min	35cycles
58℃	1min	35cycles
72℃	1min	35cycles
72℃	5min	
4℃	∞	

電気泳動例
1. TAE バッファーを満たした電気泳動漕に 2%アガロースゲルをセットし、PCR 増幅反応溶液 7.5μL と適当量のゲルローディングバッファーを混合しウェルに全量注入する。
2. 電気泳動を行う。

増幅産物の確認
電気泳動後、約 350～400bp の PCR 増幅産物の有無を確認する。

※ 植物に特異的な塩基配列を持つ内部転写スペーサー領域(ITS)を増幅する。

増幅産物の精製
増幅産物を電気泳動で確認した後、シーケンス解析を行うために PCR 反応液を精製する。

※ 約 350～400bp 以外の非特異的バンドが認められた場合は、電気泳動後、アガロースゲルから目的バンドを切り出し、精製する。

塩基配列の決定と植物種の同定
1. シーケンサーを用い PCR 増幅産物の塩基配列を決定する。
2. 公共のデータベース(GenBank、DDBJ 等)で BLAST 検索し、相同性の高い塩基配列を有する植物種を同定する。

【使用上または取扱上の注意】

※ 判定については本製品の結果だけでなく、原材料や製造記録の確認等、他の情報とあわせて、総合的に判断して下さい。

※ サンプルが植物由来の混合物の場合、波形データが重なり同定が出来ない場合がございます。

※ 本製品は研究用の試薬です。それ以外の目的には使用しないで下さい。

※ 作業環境、使用機器、操作上のコンタミネーションには十分注意して下さい。

※ 本製品は、ハウス食品株式会社のライセンスを受けて(特許第 4205485 号)、株式会社ファスマックが製造販売しています。

【問い合わせ先】

製造販売元
〒243-0041　神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3
株式会社ファスマック　遺伝子検査事業部
TEL 046-295-8787　FAX 046-294-3738
http://www.fasmac.co.jp